WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM Integnationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6:

A1

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:

WO 97/27482

G01N 33/52, C12O 1/56

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:

31. Juli 1997 (31.07.97)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP97/00337

(22) Internationales Anmeldedatum: 24. Januar 1997 (24.01.97)

(30) Prioritätsdaten:

196 02 673.3

25. Januar 1996 (25.01.96)

DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): PEREG GMBH [DE/DE]; Richard-Wagner-Strasse 60, D-84478 Waldkraiburg (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): PFEIFER, Martin [DE/DE]; Richard-Wagner-Strasse 60, D-84478 Waldkraiburg (DE).

(74) Anwalt: GLAWE, DELFS, MOLL & PARTNER; Liebherrstrasse 20, D-80538 Munchen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

(54) Title: SYNTHETIC TEST SOIL

(54) Bezeichnung: SYNTHETISCHE TESTANSCHMUTZUNG

(57) Abstract

The invention concerns a synthetic test soil for testing the efficiency of mechanical cleaning processes. The test soil contains fibrin and/or a fibrin prestage. The test soil coagulates, and can be used to test the efficiency of cleaning processes with respect to blood stains.

(57) Zusammenfassung

Gegenstand der Erfindung ist eine synthetische Testanschmutzung zum Überprüfen der Wirksamkeit maschineller Reinigungsverfahren. Die Testanschmutzung enthält Fibrin und/oder eine Fibrinvorstufe. Die Testanschmutzung gerinnt und kann zur Überprüfung der Wirksamkeit von Reinigungsverfahren im Hinblick auf Blutanschmutzungen verwendet werden.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

| AM | Armenien | GB | Vereinigtes Königreich | MX | Mexiko |
|----|--------------------------------|----|-----------------------------------|----|--------------------------------|
| AT | Österreich | GE | Georgien | NE | Niger |
| ΑU | Australien | GN | Guinea | NL | Niederlande |
| BB | Barbados | GR | Griechenland | NO | Norwegen |
| BE | Belgien | HU | Ungam | NZ | Neuseeland |
| BF | Burkina Faso | IE | Irland | PL | Polen |
| BG | Bulgarien | IT | Italien | PT | Portugal |
| BJ | Benin | JP | Japan | RO | Rumänien |
| BR | Brasilien | KE | Kenya | RU | Russische Föderation |
| BY | Belarus | KG | Kirgisistan | SD | Sudan |
| CA | Kanada | KP | Demokratische Volksrepublik Korea | SE | Schweden |
| CF | Zentrale Afrikanische Republik | KR | Republik Korea | SG | Singapur |
| CG | Kongo | KZ | Kasachstan | SI | Slowenien |
| CH | Schweiz | LI | Liechtenstein | SK | Slowakei |
| Cl | Côte d'Ivoire | LK | Sri Lanka | SN | Senegal |
| CM | Kamerun | LR | Liberia | SZ | Swasiland |
| CN | China | LK | Litauen | TD | Tschad |
| CS | Tschechoslowakei | LU | Luxemburg | TG | Togo |
| CZ | Tschechische Republik | LV | Lettland | TJ | Tadschikistan |
| DE | Deutschland | MC | Мопасо | TT | Trinidad und Tobago |
| DK | Dänemark | MD | Republik Moldau | UA | Ukraine |
| EE | Estland | MG | Madagaskar | UG | Uganda |
| ES | Spanien | ML | Mali | US | Vereinigte Staaten von Amerika |
| FI | Finnland | MN | Mongolei | UZ | Usbekistan |
| FR | Prankreich | MR | Mauretanien | VN | Vietnam |
| GA | Gabon | MW | Malawi | | |

5

Synthetische Testanschmutzung

10

15

Die Erfindung betrifft eine synthetische Testanschmutzung, die Verwendung eines Fibrinklebers zur Herstellung einer solchen Anschmutzung, einen Kit zur Herstellung einer synthetischen Testanschmutzung, ein Verfahren zum Überprüfen der Wirksamkeit eines Reinigungsverfahrens, sowie ein Kit zur Durchführung dieses Verfahrens.

Viele medizinische und chirurgische Instrumente und Apparate müssen nach ihrer Verwendung gereinigt, desinfiziert und ste20 rilisiert werden. Reinigen und desinfizieren geschieht üblicherweise in sogenannten Waschdesinfektionsautomaten. In diesen Automaten werden die Instrumente als Vorbereitung auf die anschließende Sterilisation gereinigt, desinfiziert und getrocknet.

25

30

Das Deutsche Medizinproduktegesetz und vergleichbare Bestimmungen in anderen Ländern verlangen einen Überprüfung der Wirksamkeit des angewendeten maschinellen Reinigungsverfahrens. Dies umfaßt zum einen eine Typprüfung des Verfahrens, die der Hersteller des Waschdesinfektionsautomaten vor der Markteinführung vornehmen muß. Zum anderen muß der Anwender in regelmäßigen Abständen die Reinigungsleistung der Maschine überprüfen.

2

Für die Überprüfung der Reinigungsleistung sind sogenannte Prüfkörper mit definierten Testanschmutzungen erforderlich. Die hartnäckigste und am schwierigsten zu beseitigende Verschmutzung medizinischer und chirurgischer Instrumente und Apparate ist in der Regel geronnenes Blut.

5

25

Im Stand der Technik wird die vom Hersteller vorzunehmende
Typprüfung daher häufig mit frischem Humanblut als Testanschmutzung durchgeführt. Frisches Blut ist erforderlich, da

10 bei gelagertem Blut die Gerinnung durch Zusatz von Gerinnungshemmern beeinträchtigt ist. Der Einsatz von frischem Humanblut ist jedoch für die regelmäßige Überprüfung der Reinigungsleistung beim Anwender nicht praktikabel.

Der Stand der Technik (offenkundige Vorbenutzung) schlägt daher verschiedene Testanschmutzungen wie Grießbrei, Eigelb,
sowie Stärke oder mehlhaltige Anschmutzungen vor. Da sich die
Eigenschaften all dieser Testanschmutzungen deutlich von den
Eigenschaften des Bluts unterscheiden, ist so keine oder allenfalls eine ungenaue Aussage über die Wirksamkeit des Reinigungsverfahrens gegenüber Blutanschmutzungen möglich.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, eine synthetische Testanschmutzung zu schaffen, die einfach handhabbar ist und hinsichtlich der Entfernbarkeit in einem Reinigungsverfahren dem Verhalten von frischem Humanblut ähnlicher ist als die Testanschmutzungen des Standes der Technik.

Die Erfindung löst diese Aufgabe dadurch, daß die syntheti-30 sche Testanschmutzung Fibrin und/oder eine Fibrinvorstufe enthält. Im Rahmen der Erfindung soll der Begriff "Fibrin"

3

sowohl monomeres als auch polymeres und/oder vernetztes Fibrin umfassen.

Der Begriff "synthetische Testanschmutzung" umfaßt im Rahmen

der Erfindung jegliche Testanschmutzung, bei der Fibrin

und/oder die Fibrinvorstufe separat (bspw. in isolierter

Form, nicht als Bestandteil von menschlichem oder tierischem

Nativblut) zugesetzt wurde. Der Begriff umfaßt somit nicht

Testanschmutzungen, bei denen frisches oder geronnenes Nativ
blut mit anderen Bestandteilen vermischt wird, die jeweils

kein Fibrin und keine Fibrinvorstufe enthalten.

Die Erfindung hat erkannt, daß die schwierige Entfernbarkeit einer Frischblutanschmutzung in erster Linie durch die Blutgerinnung (Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin und ggf. an-15 schließende Vernetzung) bedingt ist und daß eine fibrin- bzw. fibrinvorstufenhaltige Testanschmutzung sehr ähnliche Eigenschaften im Hinblick auf die Entfernbarkeit aufweist. Dies ist insofern überraschend, als daß die Gerinnungsfaktoren nur einen sehr geringen Anteil der Blutinhaltsstoffe ausmachen. 20 Dies sei beispielhaft erläutert. In einem Liter Humanblut sind etwa 520 ml Blutplasma enthalten, dieses Plasma enthält etwa 35 g Plasmaproteine, darin wiederum ist nur ein sehr kleiner Anteil Fibrinogen als Vorstufe des Fibrins enthalten. Die überraschende Erkenntnis der Erfindung ist nun, daß sich 25 das Verhalten von Blut in einem Reinigungsverfahren gut durch eine synthetische Testanschmutzung annähern läßt, die Fibrin und/oder eine Fibrinvorstufe enthält, obwohl Fibrinogen/Fibrin nur einen Anteil von weniger als 0,5% der Blutinhaltsstoffe ausmacht. 30

4

Die Fibrinvorstufe ist vorzugsweise Fibrinogen. Die erfindungsgemäße Testanschmutzung kann zusätzliche Blutplasmaproteine wie bspw. Albumin und/oder Hämoglobin enthalten, um die Bluteigenschaften noch besser anzunähern. Gegenstand der Erfindung ist somit eine synthetische Testanschmutzung, die sich reinigungstechnisch in guter Nährung wie Nativblut verhält, jedoch nicht aus Nativblut selbst besteht, sondern synthetisch aus verschiedenen Blutbestandteilen hergestellt wird, die die Anschmutzungseigenschaften von Blut wesentlich bestimmen.

10

Gegenstand der Erfindung ist ferner die Verwendung eines Fibrinklebers zur Herstellung einer erfindungsgemäßen syntheti-15 schen Testanschmutzung. Handelsübliche Fibrinkleber sind Zwei- oder Mehrkomponentensysteme, eine Komponente enthält Fibrinogen als Fibrinvorstufe, die andere Komponente enthält Thrombin. Thrombin ist ein proteolytisches Enzym und einer der Blutgerinnungsfaktoren, es bewirkt die Umwandlung von Fi-20 brinogen in Fibrin. In der Regel enthält ein Fibrinkleber auch noch den Blutgerinnungsfaktor XIII, der die Vernetzung von Fibrin zu Fibrinpolymeren initiiert. Andere übliche Bestandteile sind Ca2+-Ionen (Blutgerinnungsfaktor IV) als Aktivatoren der bei der Blutgerinnung wirkenden enzymatischen Systeme sowie Fibrinolytika (bspw. Plasmin oder dessen Vor-25 stufe Plasminogen) und/oder Antifibrinolytika (bspw. Aprotinin).

Ein im Rahmen der Erfindung verwendbarer Fibrinkleberkit ist 30 bspw. TISSUCOL* der Firma Immuno GmbH, 69126 Heidelberg.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Kit zur Herstellung einer synthetischen Testanschmutzung, das folgende Komponenten aufweist:

5

25

30

- a) eine Fibrinvorstufe
- b) einen Umwandlungsinitiator für die Fibrinvorstufe

Der Begriff "Umwandlungsinitiator" umfaßt jegliche Stoffe,

10 die die Umwandlung der Fibrinvorstufe in monomeres Fibrin

und/oder die Polymerisation bzw. Vernetzung von Fibrin initiieren und/oder fördern.

Es sei darauf hingewiesen, daß die Aufzählung dieser Komponenten nicht abschließend sein muß, der Kit kann auch mehr
als zwei Komponenten enthalten. So können bspw. die Fibrinvorstufe und der Umwandlungsinitiator als Feststoffe in lyophilisierter Form vorliegen, die erst mit geeigneten Lösungsmitteln in Lösung gebracht werden müssen. Diese Lösungsmittel
können dann ebenfalls Bestandteil des Kits sein.

Die Komponente a) enthält vorzugsweise Fibrinogen, die Komponenten b) vorzugsweise Thrombin. Komponente a) kann zusätzlich sonstige Blutplasmaproteine wie bspw. Albumin und/oder Hämoglobin enthalten.

Häufig ist es zweckmäßig, wenn Komponente a) den Blutgerinnungsfaktor XIII enthält, der auf Fibrin vernetzend einwirkt
und so die Gerinnung verstärkt. Auf diese Weise entsteht eine
hartnäckige und besonders schwierig zu entfernende Testanschmutzung. Bevorzugt ist auch, daß eine Komponente des Kits

Ca²⁺-Ionen (Blutgerinnungsfaktor IV) enthält. Schließlich können ggf. andere Stoffe, bspw. Fibrinolytika wie Plasminogen oder Antifibrinolytika wie Aprotinin enthalten sein.

Die Komponenten des Kits können bspw. in isotonischer Kochsalzlösung gelöst vorliegen. Alternativ können sie, wie oben schon ausgeführt, als Feststoffe (lyophilisiert) vorliegen, geeignete Lösungsmittel sind dann ebenfalls Bestandteil des Kits.

10

Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist ein Verfahren zum Überprüfen der Wirksamkeit eines Reinigungsverfahrens. Es weist folgende Schritte auf:

- a) Aufbringen einer synthetischen Testanschmutzung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4 auf einen Prüfkörper,
 - b) Unterziehen des Prüfkörpers dem zu prüfenden Reinigungsverfahren,
- c) Nachweis von Resten der Testanschmutzung auf dem Prüfkör per.

Die Prüfkörper sollen im Hinblick auf Material und Oberflächengestaltung möglichst weitgehend den in der Praxis zu reinigenden Instrumenten und Apparaten gleichen. Zur Simulation

25 der Reinigung chirurgischer Instrumente können bspw. 1 bis 2
mm dicke Edelstahlbleche mit einer Abmessung von 100 x 20 mm
verwendet werden. Verschiedene Oberflächenkonturen, wie Riffelungen, Prägungen etc., könne vorgesehen sein, um entsprechende "Schmutzecken" chirurgischer Instrumente zu simulie30 ren. Die Oberfläche der Prüfkörper kann angerauht sein (bspw.
mit Schleifkorn 180 (geschliffene Oberfläche nach DIN 17440

5

IV, Korn 180)), um die Haftung der Testanschmutzung zu verbessern und so sicherzustellen, daß der Prüfkörper eher schwerer zu reinigen ist als in der Praxis verwendete Instrumente und Apparate. Denkbar ist auch der Einsatz von Edelstahlschrauben als Prüfkörper, da Schraubenkopf und Gewinde verhältnismäßig schwierig zu reinigende Oberflächenbereiche aufweisen.

Zwecks Überprüfung der Reinigungswirkung bei Endoskopen können Prüfkörper mit innenliegenden Hohlräumen oder englumige 10 Kunststoff- oder Gummischläuche Verwendung finden. Zumindest ein Teil der Innenräume bzw. Schlauchlumina sollte von außen sichtbar sein (bspw. durch Verwendung transparenten Schlauchmaterials), um den vorzugsweise eine optische Überprüfung umfassenden Nachweis von Resten der Testanschmutzung 15 auf dieser Oberfläche zu ermöglichen. Das Aufbringen der synthetischen Testanschmutzung kann bspw. durch Aufsprühen der Komponenten eines Kits gemäß einem der Ansprüche 6 bis 11 oder durch sonstiges Auftragen geschehen. An den Schritt des Aufbringens kann sich vorzugsweise ein Schritt anschließen, 20 in dem die Testanschmutzung gerinnen gelassen und/oder getrocknet wird. Das Gerinnen kann auch während des Trocknens erfolgen, so daß dann ein separater Gerinnungsschritt entbehrlich ist. Häufig wird es jedoch vorzuziehen sein, der Testanschmutzung vor dem Trocknen Zeit zum Gerinnen zu geben. 25 Der Prüfkörper kann zu diesem Zweck bspw. ca. 10 min bei $20\,^{\circ}\mathrm{C}$ einer Umgebung mit einer relativen Luftfeuchtigkeit von 90% ausgesetzt werden. Der Begriff "Gerinnen" im Sinne der Erfindung umfaßt die Umwandlung etwaig vorhandener Fibrinvorstufen 30 (Fibrinogen) in Fibrin. Vorzugsweise umfaßt die Gerinnung zusätzlich noch die Polymerisation der Fibrinmonomere zu einem

8

Fibrinnetzwerk, bevorzugt unter der Einwirkung des Blutgerinnungsfaktors XIII sowie Ca²⁺ als Cofaktor
(Blutgerinnungsfaktor IV). Ein solches polymerisiertes und
quervernetztes Fibrinnetzwerk simuliert besonders gut diejenigen Verhältnisse, die bei einer geronnenen Blutverschmutzung medizinischer Instrumente vorhanden sind.

Das Trocken der Testanschmutzung kann bei Raumtemperatur erfolgen, geeignete Zeiträume können bspw. zwischen 1 und 24 h liegen. Auch ein Trocknen bei erhöhter Temperatur (bspw. 40°C) für bspw. 1 h ist möglich. Eine besonders hartnäckige Testanschmutzung kann geschaffen werden, wenn die ggf. geronnene und getrocknete erfindungsgemäße Testanschmutzung zusätzlich mit Desinfektionsmitteln behandelt und damit teilweise denaturiert wird. Denaturierte Blutrückstände sind besonders schwierig zu entfernen und treten in der Praxis dann auf, wenn bspw. chirurgische Instrumente entweder unmittelbar nach ihrer Benutzung oder einige Zeit später in Behälter mit Desinfektionslösung aufbewahrt werden.

20

5

10

15

Diese Vorbereitung des Prüfkörpers kann entweder beim Anwender erfolgen, alternativ können jedoch, wie weiter unten noch erläutert, Testkits geschaffen werden, die entsprechend vorbereitete Prüfkörper enthalten.

25

Der oder die "testverschmutzten" Prüfkörper werden anschließend dem zu prüfenden Reinigungsverfahren unterzogen. Nach Abschluß der Reinigung erfolgt ein Nachweis etwaiger Reste der Testanschmutzung auf dem Prüfkörper. 5

Bevorzugt und für den Anwender am einfachsten durchzuführen ist ein visueller Nachweis etwaiger Reste, bevorzugt nach Durchführung einer Farbreaktion, die auf dem Prüfkörper vorhandene Proteinreste anfärbt. Eine übliche und dem Fachmann geläufige Nachweisreaktion für Proteine ist bspw. die Biuret-Reaktion. Die folgende, nicht abschließende Aufzählung enthält weitere Beispiele für mögliche Nachweisreaktionen:

Kjeldahlsche Reaktion, Lowrysche Reaktion, Millonsche Reaktion, Ninhydrinreaktion, Paulysche Reaktion, Xanthoproteinreaktion.

Eine separate Proteinfarbreaktion kann entbehrlich sein, wenn die erfindungsgemäße Testanschmutzung Hämoglobin enthält, das ein optisches Erkennen der Restanschmutzung wesentlich erleichtert.

Eine etwas aufwendigere Möglichkeit ist die Hydrolyse der noch am Prüfkörper haftenden Proteine und eine Analyse der 20 als Hydrolyseprodukte resultierenden Aminosäuren.

Sofern ein quantitativer Nachweis erforderlich ist, enthalten die Proteine der Testanschmutzung bevorzugt radioaktive Tracer wie bspw. 99mTc. Die Reinigungswirkung läßt sich dann durch Messung der von dem Prüfkörper ausgehenden γ-Strahlung des 99mTc vor und nach der Reinigung messen. Auf diese Weise läßt sich die erfindungsgemäße synthetische Testanschmutzung bzw. das erfindungsgemäße Prüfverfahren auch eichen, da Vergleichsmessungen mit Nativblut durchgeführt werden können, das ebenfalls mit 99mTc versehen ist. Man kann die Zusammen-

WO 97/27482

25

30

10

PCT/EP97/00337

setzung der erfindungsgemäßen Testanschmutzung variieren und so ihr Verhalten gegenüber einer Reinigung weitestgehend dem Verhalten von Nativblut angleichen.

- 5 Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Kit zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens, das folgende Bestandteile enthält:
- einen Prüfkörper, der mit einer synthetischen Testan
 schmutzung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4 versehen ist,
 - Nachweisreagenzien zum Nachweis von Resten der Testanschmutzung.

Dieser Kit ermöglicht jedem Anwender eine einfache laufende

Überprüfung der Wirksamkeit seines Waschdesinfektionsautomaten. Der oder die fertig vorbereiteten Prüfkörper wird/werden
dem Kit entnommen und dem zu prüfenden Reinigungsverfahren
unterzogen. Anschließend erfolgt mit dem in Kit enthaltenden
Nachweisreagenzien in der oben geschilderten Weise ein Nachweis und eine visuelle Beurteilung von Resten der Testanschmutzung.

Als Nachweisreaktion wird bevorzugt die Biuret-Reaktion verwendet. Die Nachweisreagenzien enthalten dann zum einen eine alkalische wäßrige Lösung und zum anderen eine wäßrige Lösung von Cu²+-Ionen. Die alkalische wäßrige Lösung enthält vorzugsweise zusätzlich einen Komplexbildner für Cu²+-Ionen, um ein Ausfallen von Kupfer(II)hydroxid in dem alkalischen Milieu zu vermeiden. Als geeigneter Komplexbildner kann bspw. Nitrilotriessigsäure (NTA) oder deren Salze Verwendung fin-

den. Andere bekannte und dem Fachmann geläufige Komplexbildner (EDTA etc.) für Cu²⁺-Ionen sind ebenfalls geeignet.

Nachfolgend werden Ausführungsbeispiele der Erfindung beschrieben. Alle Prozentangaben sind Gewichtsprozent.

Beispiel 1

5

In diesem Beispiel wird die Herstellung von Komponenten eines

10 Kits zur Herstellung einer erfindungsgemäßen synthetischen
Testanschmutzung beschrieben.

Komponente a):

0,4 g Fibrinogen und 200 E Blutgerinnungsfaktor XIII werden
in 50 ml isotonischer (0,9%iger) Kochsalzlösung gelöst. Eine
Einheit E Blutgerinnungsfaktor XIII entspricht derjenigen Aktivität, die in 1 ml frischem Normalplasma enthalten ist.

Komponente b):

20 2.500 I.E. Thrombin (human), 8 g Albumin und 30 mg CaCl₂•2H₂O werden in 50 ml isotonischer Kochsalzlösung gelöst. Eine Internationale Einheit (I.E.) Thrombin ist definiert als jene Aktivität, die in 0,0853 mg des 1. internationalen Standards von humanen Thrombin enthalten ist.

25

Bezogen auf die Gesamtflüssigkeitsmenge der beiden Komponenten (100 ml) beträgt der Fibrinogenanteil 0,4 Gew.-% und der Albuminanteil 8 Gew.-%. Diese Anteile können variiert werden (bspw. im Bereich 0,1 bis 0,5 Gew.-% bzw. 5 bis 10 Gew.-%),

30 um die "Hartnäckigkeit" der aus den Komponenten herzustellenden Testanschmutzung zu variieren.

12

Die Inhaltsstoffe der Komponenten a) und b) sind als Bestandteile eines Fibrinkleberkits erhältlich, bspw. des oben schongenannten Kits TISSUCOL* der Immuno GmbH.

5

Der gemäß diesem Beispiel hergestellte Kit enthält den Blutgerinnungsfaktor XIII sowie Calciumchlorid als Cofaktor, um
die Vernetzung von Fibrin zu einem polymeren Netzwerk zu fördern und so eine hartnäckige Verschmutzung herzustellen. So10 fern eine besonders hartnäckige Testanschmutzung erwünscht
ist, können die Komponenten a) und b) auch höher konzentriert
werden, bspw. können die genannten Protein- und Hilfsstoffmengen in jeweils lediglich 5 ml isotonischer Kochsalzlösung
gelöst werden.

15

20

Beispiel 2

In diesem Beispiel wird die Herstellung von Komponenten eines zweiten Kits zur Herstellung einer erfindungsgemäßen synthetischen Testanschmutzung beschrieben.

Komponente a):

0,4 g Fibrinogen werden in 50 ml isotonischer (0,9%iger) Kochsalzlösung gelöst.

25

Komponente b):

25 I.E. Thrombin (human), 8 g Albumin, 8 g Hämoglobin und 30 mg CaCl₂•2H₂O werden in 50 ml isotonischer Kochsalzlösung gelöst.

5

Bezogen auf die Gesamtflüssigkeitsmenge der beiden Komponenten (100 ml) beträgt der Fibrinogenanteil 0,4 Gew.-% und der Albumin- und Hämoglobinanteil 8 Gew.-%. Diese Anteile können variiert werden (bspw. im Bereich 0,1 bis 0,5 Gew.-% bzw. 5 bis 10 Gew.-%), um die "Hartnäckigkeit" der aus den Komponenten herzustellenden Testanschmutzung zu variieren.

Bei diesem Kit ist der Thrombinanteil in Komponente b) deutlich vermindert worden, um ein Gerinnen schon während des

Auftragens der Testanschmutzung zu vermeiden. Durch den Hämoglobinanteil kann eine visuelle Beurteilung etwaiger Reste
der Testanschmutzung erfolgen, ohne daß eine separate Farbreaktion zur Sichtbarmachung durchgeführt werden muß.

15 Beispiel 3

Herstellung der Komponenten eines Nachweisreagenz.

Lösung 1: 3 g NaOH und 4 g NTA (Nitrilotriessigsäure) werden 20 in 50 ml Wasser gelöst.

Lösung 2: 5 g CuSO₄•5H₂O werden in 50 ml Wasser gelöst.

Diese beiden Lösungen zusammen ergeben das Nachweisreagenz 25 für die Biuret-Reaktion.

Beispiel 4

Versehen eines Prüfkörpers mit der Testanschmutzung

Als Prüfkörper wird ein Edelstahlblech der Größe $100 \times 20 \text{ mm}$, Stärke 2 mm, verwendet. Die Oberfläche des Blechs ist eine geschliffene Oberfläche gemäß DIN 17440 IV, Korn 180.

Die Oberfläche des Prüfkörpers wird mit gleichen Volumenanteilen der Komponenten a) und b) aus Beispiel 1 benetzt.

Bspw. können die beiden Komponenten a) und b) gleichzeitig auf die zu benetzende Prüfkörperoberfläche aufgesprüht oder auf andere Weise aufgetragen werden.

10

15

Anschließend läßt man die Testanschmutzung bei Raumtemperatur (20°C) und 90% relativer Luftfeuchtigkeit 10 min lang gerinnen. Das Gerinnen umfaßt die Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin sowie die Vernetzung der Fibrinmonomere zu einem polymeren Netzwerk. Nach dem Gerinnen wird der Prüfkörper im Trokkenschrank bei 40°C 1 h lang getrocknet. Nach dem Trocknen ist der Prüfkörper einsatzfertig. Er kann, ggf. zusammen mit einem Nachweisreagenz gemäß Beispiel 3, an einen Anwender versandt werden.

20

Beispiel 5

Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens

Der Prüfkörper gemäß Beispiel 4 wird in den zu prüfenden Waschdesinfektionsautomaten eingestellt und einem üblichen Reinigungszyklus unterzogen.

Gleiche Mengen der Lösungen 1 und 2 aus Beispiel 3 werden
30 miteinander zu einem Nachweisreagenz vermischt, in das der
gereinigte Prüfkörper eingetaucht wird. Die Verweildauer des

Prüfkörpers im Nachweisreagenz beträgt vorzugsweise mindestens 60 s. Sofern am Prüfkörper noch Proteinreste vorhanden sind, komplexieren die Peptidbindungen und (sofern vorhanden) Tyrosinreste die Cu²+-Ionen zu einem purpurfarbenen Komplex. Somit sind Reste der Testanschmutzung auf der Prüfkörperoberfläche durch eine purpurfarbene Verfärbung erkennbar. Mit diesem Nachweisverfahren können Proteinreste bis hinab zu einer Grenze von etwa 1 bis 4 $\mu g/cm^2$ auf der Metalloberfläche noch visuell erkannt werden.

10

16

Patentansprüche

- Synthetische Testanschmutzung, dadurch gekennzeichnet,
 daß sie Fibrin und/oder eine Fibrinvorstufe enthält.
 - Synthetische Testanschmutzung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Fibrinvorstufe Fibrinogen ist.
- 10 3. Synthetische Testanschmutzung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß sie zusätzlich Blutplasmaproteine enthält.
- 4. Synthetische Testanschmutzung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß sie Albumin und/oder Hämoglobin enthält.
 - 5. Verwendung eines Fibrinklebers zur Herstellung einer syn-thetischen Testanschmutzung.

20

- 6. Kit zur Herstellung einer synthetischen Testanschmutzung, gekennzeichnet durch folgende Komponenten:
 - a) eine Fibrinvorstufe
 - b) einen Umwandlungsinitiator für die Fibrinvorstufe

- 7. Kit nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß Komponente a) Fibrinogen enthält.
- Kit nach Anspruch 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß
 Komponente b) Thrombin enthält.

- 9. Kit nach einem der Ansprüche 6 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß Komponente a) zusätzlich Blutplasmaproteine
 enthält.
- 5 10. Kit nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß Komponente a) Albumin und/oder Hämoglobin enthält.
 - 11. Kit nach einem der Ansprüche 6 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Komponenten des Kits in isotonischer Kochsalzlösung gelöst vorliegen.
 - 12. Verfahren zum Überprüfen der Wirksamkeit eines Reinigungsverfahrens, gekennzeichnet durch folgende Schritte:
 - a) Aufbringen einer synthetischen Testanschmutzung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4 auf einen Prüfkörper,
 - b) Unterziehen des Prüfkörpers dem zu prüfenden Reinigungsverfahren,
 - c) Nachweis von Resten der Testanschmutzung auf dem Prüfkörper.

20

10

- 13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Testanschmutzung nach dem Aufbringen gerinnen gelassen und/oder getrocknet wird.
- 25 14. Verfahren nach Anspruch 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, daß der Nachweis von Resten der Testanschmutzung durch eine chemische Farbreaktion und anschließende visuelle Beurteilung erfolgt.
- 30 15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß als chemische Farbreaktion die Biuret-Reaktion verwendet

PCT/EP97/00337

wird.

- 16. Kit zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 12 bis 15, gekennzeichnet durch folgende Bestandteile:
 - einem Prüfkörper, der mit einer synthetischen Testanschmutzung nach einem der Ansprüche 1 bis 4 versehen ist,
- Nachweisreagenzien zum Nachweis von Resten der Testan-10 schmutzung.
 - 17. Kit nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Nachweisreagenzien enthalten:
 - eine alkalische wäßrige Lösung
- 15 eine wäßrige Lösung von Cu²⁺.
 - 18. Kit nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß die alkalische wäßrige Lösung zusätzlich einen Komplexbildner für Cu²+-Ionen enthält.

20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interr Nal Application No PCI/EP 97/00337

| A. CLASSI IPC 6 | GO1N33/52 C12Q1/56 | | • |
|--|--|--|---|
| According to | o International Patent Classification (IPC) or to both national classi | fication and IPC | |
| B. FIELDS | SEARCHED | | |
| Minimum d IPC 6 | ocumentation searched (classification system followed by classificat ${\sf G01N}$ | ion symbols) | |
| Documentat | tion searched other than minimum documentation to the extent that | such documents are included in the fields searched | |
| Electroruc d | lata base consulted during the international search (name of data ba | e and, where practical, search terms used) | |
| C. DOCUM | MENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the r | elevant passages Relevan | nt to claim No. |
| A | EP 0 480 843 A (TERUMO KABUSHIKI 15 April 1992 see the whole document | KAISHA) 6-8 | |
| A | CLINICAL CHEMISTRY, vol. 34, no. 2, 1988, pages 430-431, XP002009810 E.M. TZVETANOVA ET AL.: "Improvemethod for determination of fibrisee the whole document | | |
| Fur | ther documents are listed in the continuation of box C. | X Patent family members are listed in annex. | |
| 'A' docum consider filing 'L' docum which citatic 'O' docum other 'P' docum later to | nent defining the general state of the art which is not dered to be of particular relevance or document but published on or after the international date the nent which may throw doubts on priority claim(s) or is cited to establish the publication date of another on or other special reason (as specified) the nent referring to an oral disclosure, use, exhibition or means the nent published prior to the international filing date but than the priority date claimed eractual completion of the international search | "T" later document published after the international filing or priority date and not in conflict with the applicate cited to understand the principle or theory underlying invention." X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered involve an inventive step when the document is taked document of particular relevance; the claimed inventionation of the considered to involve an inventive step with document is combined with one or more other such ments, such combination being obvious to a person in the art. &' document member of the same patent family Date of mailing of the international search report | tion but ing the ition it to en alone when the idocu- |
| 1 | 13 May 1997 | 05.06.97 | |
| Name and | mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentiaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (-31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo ni, | Authorized officer | |
| | Fauc (+ 31-70) 340-3016 | Cartagena y Abella,P | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

formation on patent family members

Inter onal Application No
PCI/EP 97/00337

| | | PC1/EP 97/00337 | | 9//0033/ |
|--|------------------|----------------------------|------------|----------------------|
| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | , | Publication date |
| EP 480843 A | 15-04-92 | JP 414676 AU 857369 | 5 A L A | 20-05-92 16-04-92 |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internonales Aktenzeichen
PC1/EP 97/00337

| A. KLASSI IPK 6 | IFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES G01N33/52 C12Q1/56 | | - |
|--|--|---|--|
| Nach der in | nternationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen KI | lassifikation und der IPK | |
| | RCHIERTE GEBIETE | | |
| | ter Mindestprufstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbo | ole) | |
| IPK 6 | G01N | | |
| Recherchier | rte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, so | oweit diese unter die recherchierten Gebiete | : fallen |
| Während de | er internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (N | lame der Datenbank und evtl. verwendete | Suchbegnife) |
| C. ALS W | ESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN | | 4-7 |
| Kategone* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angab | ne der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
| A | EP 0 480 843 A (TERUMO KABUSHIKI 15.April 1992 siehe das ganze Dokument | KAISHA) | 6-8 |
| A | CLINICAL CHEMISTRY, Bd. 34, Nr. 2, 1988, Seiten 430-431, XP002009810 E.M. TZVETANOVA ET AL.: "Improve method for determination of fibri siehe das ganze Dokument | | 15 |
| | itere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu | X Siehe Anhang Patentfamilie | |
| Besondere A' Veröff aber n E' älteres Anme 'L' Veröff schein andere soll og ausgel 'O' Veröff dem b Daturn des | fentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist i Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen eldedatum veröffentlicht worden ist fentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erhen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer en im Recherchenbencht genannten Veröffentlichung belegt werden der die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie führt) fentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht | "T" Spätere Veröffentlichung, die nach der oder dem Priontatsdatum veröffentlich Anmeldung nicht kollidiert, sondern n Erfindung zugrundeliegenden Prinzips Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bede kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung von besonderer Bede | ht worden ist und mit der jur zumVerständnis des der is oder der ihr zugrundeliegenden eutung; die beanspruchte Erfindung lichung nicht als neu oder auf achtet werden eutung; die beanspruchte Erfindung gkeit berühend betrachtet it einer oder mehreren anderen in Verbindung gebracht wird und in naheliegend ist een Patentfamilie ist |
| ļ | Postanschnitt der Internationale Recherchenbehorde | Bevollmächtigter Bediensteter | |
| | Europáisches Patentiamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016 | Cartagena y Abell | la,P |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichu

, die zur selben Patentfamilie gehoren

Internal Policy Property | Policy EP 97/00337

| | | | | | | 9//0033/ |
|--|--------------|-------------------------------|----------|-----------------------------------|--------|-------------------------------|
| Im Recherchenberi angeführtes Patentdok | cht ument | Datum der Veroffentlichung | M | litglied(er) des Patentfamilie | | Datum der Veröffentlichung |
| EP 480843 | A | 15-04-92 | JP AU | 4146766 8573691 | A A | 20-05-92 16-04-92 |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |